

影响大豆愈伤组织的诱导因素研究

张郁松

(西安武警工程学院军事经济系, 西安 710086)

摘要 比较 MS、B5、N6 三种基本培养基, 发现 MS 适合作为诱导大豆愈伤组织的基本培养基。添加激素 6-BA 0.5mg/L, 2,4-D 2.0mg/L 时愈伤组织诱导的效果最好, 过高或过低的浓度激素均不利于愈伤组织的诱导和生长; 不同外植体诱导愈伤组织的能力不一样, 下胚轴诱导愈伤组织能力强于子叶; 在所选择的六种大豆品种中, 中黄 13 诱导愈伤组织的能力最强; 光照条件为 12h/d 时有利于愈伤组织的诱导; 培养基 pH5.8~6.0 时, 愈伤组织的诱导率比较高。

关键词 大豆; 愈伤组织; 诱导

中图分类号 S 565.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)01-0066-05

RESEARCH ON AFFECTIVE FACTOR OF SOYBEAN CALLUS INDUCTION

ZHANG Yu-song

(Xi'an Engineering College of Armed Police Force, Xi'an, 710086)

Abstract Among the 3 media tested, MS was the most suitable for the callus induction of soybean. The medium added hormone with 0.5mg/L 6-BA and 2.0 mg/L 2,4-D was the best one for the induction of callus. Neither higher nor lower would suitable for the induction of callus. The effects of explants type on soybean callus induction were different, and the hypocotyls was more effective than cotyledon on soybean callus induction. Among the 6 soybean types, zhong-huang13 was the most suitable for the callus induction of soybean. 12 hour light and 12 hour dark were benefit for the callus induction. The best pH for the callus induction and subculture was between 5.8 and 6.0.

Key words Soybean; Callus; Induction

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试大豆品种中黄 13、秦豆 8 号、M40、东大 2 号、康达 1 号、金豆 1 号由金威特杂交小麦公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 从每种供试材料中, 挑选

色泽鲜亮、粒大、饱满、种皮无破损、无霉病斑的种子, 用 75% 酒精消毒 1min, 无菌水冲洗 1 次, 然后用 2% 的 NaClO 溶液中浸泡 15min, 在超净台上用无菌水冲洗 4 次, 将处理好的种子装入含有 12mL 无菌水的 100mL 三角瓶中, 每瓶 10 粒, 在组织培养室中于 (25±1)℃ 下培养。

1.2.2 愈伤组织的诱导 无菌苗培养 5~7d 后, 选取下胚轴和子叶为外植体诱导愈伤组织, 下胚轴

剪成 1~2mm 的小段,子叶切块取无菌苗已萌发呈绿色的子叶部分,切成 5mm 左右的小块,接种在诱导愈伤组织的培养基中,(25±1)℃,在不同条件下诱导愈伤组织。观察出愈时间,愈伤组织的颜色、质地及生长势,在诱导 24d 后统计出愈块数,计算愈伤组织诱导率。

愈伤组织诱导率 = 出现愈伤组织的外植体数 / 总的接种外植体数 × 100%

1.2.2.1 基本培养基种类对愈伤组织诱导的影响

以中黄 13 大豆无菌苗的下胚轴和子叶为外植体,培养基的筛选采用 MS、B5、N6 三种培养基均附加 3.0% 蔗糖、0.8% 琼脂、2.0mg/L 2,4-D、0.5mg/L 6-BA、100mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,温度(25±1)℃,光照培养(1000~1500Lx,12h/d)。

1.2.2.2 激素对愈伤组织诱导的影响 以中黄 13 大豆无菌苗的下胚轴和子叶为外植体,MS 培养基为基本培养基,附加不同激素浓度,3.0% 蔗糖,0.8% 琼脂,100mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,温度(25±1)℃,光照培养(1000~1500Lx,12h/d)。

1.2.2.3 外植体种类对愈伤组织诱导的影响

以中黄 13 大豆无菌苗的下胚轴与子叶切块为外植体,MS+2,4-D2.0mg/L+6-BA0.5mg/L 为培养基,附加 3.0% 蔗糖,0.8% 琼脂,100mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,温度(25±1)℃,光照培养(1000~1500Lx,12h/d)。

1.2.2.4 大豆基因型差异对形成愈伤组织的影响

分别以 6 种大豆无菌苗的下胚轴为外植体,MS+2,4-D2.0mg/L+6-BA0.5mg/L 为培养基,附加 3.0% 蔗糖,0.8% 琼脂,100mg/L 水解乳蛋白,

pH6.0,温度(25±1)℃,光照培养(1000~1500Lx,12h/d)。

1.2.2.5 光照条件对愈伤组织诱导的影响 以 MS+2,4-D2.0mg/L+6-BA0.3mg/L 为培养基,附加 3.0% 蔗糖,0.8% 琼脂,100mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,培养温度为(25±1)℃,设计连续 24h、12h/d 光照培养(1000~1500Lx)和暗培养三种光照条件,暗光培养时将培养瓶放于培养架上并用黑布覆盖,进行光暗条件对中黄 13 大豆下胚轴愈伤组织形成的影响实验。

1.2.2.6 培养基 pH 对愈伤组织诱导的影响

以 MS+2,4-D2.0mg/L+6-BA0.5mg/L 为培养基,附加 3.0% 蔗糖,0.8% 琼脂,100mg/L 水解乳蛋白,pH6.0,培养温度为(25±1)℃,设计 5.0,5.4,5.8,6.0,6.5 五种 pH 的培养基,进行培养基 pH 对愈伤组织诱导的影响实验。

2 结果与讨论

2.1 基本培养基种类对愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知,在大豆下胚轴愈伤组织的诱导中,以 MS 诱导诱导率最高,达到 100.00%,N6 次之,诱导率为 76.67%,B5 培养基诱导率为 72.41%。不同的基本培养基愈伤组织生长状况也不同,MS 诱导的愈伤组织生长较快,颜色为黄绿色有光泽,较松散,生长旺盛;N6 培养基诱导的愈伤组织呈黄绿色,生长比较旺盛;而 B5 培养基诱导的愈伤组织呈淡黄色无光泽,生长缓慢,易褐化。因此认为,MS 培养基适合于大豆下胚轴愈伤组织的诱导。

表 1 不同基本培养基对大豆下胚轴愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different basic media on soybean hypocotyl callus induction

基本培养基 Basic media	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	愈伤组织诱导率(%) Rate of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长状况 Growth status of the callus
MS	30	30	100.00	黄绿色有光泽	++++
B5	29	21	72.41	淡黄色无光泽	++
N6	30	23	76.67	黄绿色有光泽	+++

表 2 不同基本培养基对大豆子叶愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different basic media on soybean cotyledon callus induction

基本培养基 Basic media	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	愈伤组织诱导率(%) Rate of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长状况 Growth status of the callus
MS	28	24	85.71	黄绿色有光泽	++++
B5	26	19	73.08	淡黄色无光泽	++
N6	30	22	73.33	黄绿色有光泽	+++

由表 2 可以看出,在 MS、B5、N6 三种培养基上,MS 诱导效果最好,诱导率最高,达到 85.71%,

B5、N6 诱导率差别不明显,分别为 73.08% 和 73.33%。各培养基诱导的愈伤组织生长状况也有差

别,MS 诱导的愈伤组织呈黄绿色,质量好,质地疏松,生长旺盛。N6 培养基诱导的愈伤组织呈黄绿色,生长比较旺盛;而 B5 培养基诱导的愈伤组织呈

淡黄色无光泽,生长缓慢,易褐化,15d 左右出现褐化坏死现象。所以 MS 培养基对大豆子叶愈伤组织的诱导较为理想。

表 3 不同浓度激素对大豆下胚轴愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of hormone on soybean hypocotyl callus induction

2,4-D 浓度/ (mg/L)2,4-D Concentration	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	愈伤组织诱导率(%) Rate of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长状况 Growth status of the callus
0.5	30	22	73.33	黄绿色有光泽	+++
1.0	28	24	85.71	黄绿色有光泽	++++
2.0	30	30	100.00	黄绿色有光泽	++++
4.0	29	20	68.97	淡黄色无光泽	++

2.2 激素对愈伤组织诱导的影响

下胚轴培养 3d 后,两端开始膨大变白,6d 时大部分外植体开始从两端长出愈伤组织。培养 15d 时,3 种生长素各浓度处理的外植体出愈率、愈伤组织的生长情况和颜色已有明显差异。在不同浓度的 2,4-D 中(表 3),以 2.0mg/L 处理的出愈率最高,为 100%,所诱导的愈伤组织黄绿色有光泽,质地松软,生长也最好。2,4-D 浓度为 4.0mg/L 时,愈伤组织的出愈率仅为 68.97%,诱导出来的愈伤组织淡黄色无光泽,愈伤组织质地较硬,生长缓慢。可见过高或

过低的浓度激素均不利于愈伤组织的诱导和生长。

子叶接种后 4d 表面开始发皱,7d 时在切口处长出黄绿色愈伤组织,第 9d 叶缘已有米粒大黄绿色愈伤组织长出,18d 后 3 种生长素浓度处理的外植体出愈率、愈伤组织的生长情况和颜色已有明显差别(表 4)。其中 1.0mg/L、2.0mg/L 2,4-D 处理比 0.5mg/L、4.0mg/L 的出愈早 2~3d,出愈率比较高,所诱导的愈伤组织生长也比较好。2,4-D 浓度为 4.0mg/L 时,愈伤组织的出愈率仅为 68.19%,诱导出来的愈伤组织淡黄色无光泽,愈伤组织生长缓慢。

表 4 不同浓度激素对大豆子叶愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of hormone on soybean cotyledon callus induction

2,4-D 浓度/ (mg/L)2,4-D Concentration	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	愈伤组织诱导率(%) Rate of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长状况 Growth status of the callus
0.5	24	16	66.7	黄绿色有光泽	+++
1.0	24	18	75.00	黄绿色有光泽	++++
2.0	23	20	86.96	黄绿色有光泽	++++
4.0	22	15	68.19	淡黄色无光泽	++

表 5 外植体种类对愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effects of explants type on soybean callus induction

外植体种类 Type of explant	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	愈伤组织诱导率(%) Rate of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长状况 Growth status of the callus
下胚轴 Hypocotyl	30	30	100.00	黄绿色有光泽	++++
子叶 Cotyledon	23	20	86.96	黄绿色有光泽	++++



图 1 从大豆下胚轴诱导的愈伤组织
Fig.1 Callus of soybean hypocotyl



图 2 从大豆子叶诱导的愈伤组织
Fig.2 Callus of soybean cotyledon

2.3 外植体种类对愈伤组织诱导的影响

下胚轴培养 3d 后,两端开始膨大变白,6d 时大部分外植体开始从两端长出愈伤组织。子叶接种后 4d 表面开始发皱,7d 时在切口处长出黄绿色愈伤

组织,第 9d 叶缘已有米粒大黄绿色愈伤组织长出。从表 5 可以看出,在相同条件下,下胚轴诱导愈伤组织能力强于子叶。

表 6 大豆基因型差异对形成愈伤组织的影响

Table 6 Effects of genotype on soybean callus induction

品种 Cultivar	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	愈伤组织诱导率(%) Rate of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长状况 Growth status of the callus
中黄 13 Zhonghuang13	30	30	100.00	黄绿色有光泽	++++
秦豆 8 号 Qindou 8	30	26	86.67	淡黄色有光泽	++++
M40	19	16	84.21	淡黄色无光泽	+++
康达 1 号 Kangda 1	20	17	85.00	淡黄色无光泽	+++
东大 2 号 Dongda 2	21	17	80.95	淡绿色有光泽	+++
金豆 1 号 Jindou 1	19	16	84.21	淡绿色有光泽	+++

2.4 大豆基因型差异对形成愈伤组织的影响

从表 6 可以看出,中黄 13 诱导愈伤组织能力最强,其他的品种诱导率相差不大;中黄 13 和秦豆 8

号诱导的愈伤组织有光泽,质量好,质地疏松,生长旺盛;M40 和康达 1 号诱导的愈伤组织无光泽,质地较硬,继代后培养后逐渐产生光泽,但生长缓慢。

表 7 光照条件对愈伤组织诱导的影响

Table 7 Effects of light on soybean callus induction

光照条件 Condition of light	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	愈伤组织诱导率(%) Rate of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长状况 Growth status of the callus
连续 24 h 光照 Light	30	22	73.33	黄绿色无光泽	++
12h 光照 12h light~12h dark	30	30	100.00	黄绿色有光泽	++++
连续 24 h 暗光 Dark	29	28	95.55	淡黄色无光泽	+++

2.5 光照条件对愈伤组织诱导的影响

由表 7 可知,光照 12h/d 和连续暗光处理的愈伤组织诱导率比较高,连续光照 24h 处理的愈伤组织诱导率比较低。不同条件下愈伤组织颜色和继代培养后生长情况差异较大,光照 12h/d 处理的愈伤组织呈黄绿色,质地松软,有光泽,生长旺盛,继代培养后生长较好,连续暗光处理诱导出的愈伤组织在量上和 12h 光照处理差异不大,但其愈伤组织呈淡黄色,质地松软,没有光泽,继代后在暗光处理下生长缓慢,在 12h/d 光照处理下,会逐渐变得有光泽,生长旺盛;24h 全光照处理诱导的愈伤组织质地较硬,没有光泽,生长缓慢,继代培养后很快干枯死亡。

2.6 培养基 pH 值对愈伤组织诱导的影响

由表 8 可知,pH5.0、pH5.4 愈伤组织的诱导率比较低,愈伤组织质地较硬,没有光泽,愈伤组织的生长受到抑制;pH5.8、pH6.0 愈伤组织的诱导率比较高,愈伤组织呈黄绿色,质地松软,有光泽,生长旺盛,继代培养后生长较好。pH 值是影响愈伤组织生长的一个重要因素,pH 环境影响质膜的渗透性及愈伤组织对物质的吸收程度,合适的 pH 环境有高的愈伤组织诱导率,对于中黄 13 大豆下胚轴,在附加 2,4-D2.0mg/L、6-BA0.5mg/L 的 MS 培养基中,pH6.0 是最佳的 pH 条件。

表 8 培养基 pH 值对愈伤组织诱导的影响

Table 8 Effects of pH on soybean callus induction

培养基 pH Medium pH	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	愈伤组织诱导率(%) Rate of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长状况 Growth status of the callus
5.0	30	21	70.00	淡黄色无光泽	++
5.4	30	25	83.33	淡黄色无光泽	+++
5.8	29	28	95.55	黄绿色有光泽	++++
6.0	30	30	100.00	黄绿色有光泽	++++
6.5	28	26	92.86	淡绿色无光泽	+++

3 小结

MS 适合作为诱导大豆愈伤组织的基本培养基,激素条件为 6-BA0.5mg/L,2,4-D2.0mg/L,过高或过低的浓度激素均不利于愈伤组织的诱导和生长;不同外植体诱导愈伤组织的能力不一样,下胚轴诱导愈伤组织能力强于子叶;在所选择的六种大豆品种中,中黄 13 诱导愈伤组织的能力最强,且诱导出愈伤组织有光泽,质量好;三种光照条件下,光照 12h/d 处理诱导愈伤组织的效果最好,质地松软,有光泽,生长旺盛,继代培养后生长较好;pH5.8~6.0 间,愈伤组织的诱导率比较高。

参 考 文 献

- [1] 祁永斌,李和平,高春生,等.不同小麦品种愈伤组织诱导和再生体系建立[J].武汉植物学研究,2005,23(3):227-232.
- [2] 张红梅,刘小红,张红伟,等.不同杂种优势类群玉米幼胚愈伤组织的诱导及植株再生特性的研究[J].西北植物学报,2004,24(1):50-55.
- [3] 谭中文,梁计南,谭志勇,等.甘蔗不同基因型愈伤组织生化性状的研究[J].华南农业大学学报(自然科学版),2004,25(1):14-17.
- [4] 邓士政,付金峰,季良越.玉米愈伤组织再生植株的促进方法研究[J].河南农业大学学报,2005,39(1):5-9.
- [5] 原亚萍,母秋华,贾玉峰,等.常规玉米自交系及其杂种幼胚培养反应的研究[J].吉林农业大学学报,1997,19(1):16-20.
- [6] 陈英,曹毅,周先礼,等.玉米幼胚的组织培养及植株再生的研究[J].四川大学学报(自然科学版),1999,36(6):1125-1129.
- [7] 袁鹰,刘德璞,郑培和,等.东北玉米自交系胚性愈伤组织的诱导[J].玉米科学,2001,9(1):37-38.

第二届植物分子育种国际学术研讨会

2007年3月23~27日在海南省三亚市召开

现代农业已经发展到了“分子农业”时代,基因工程、转基因技术等分子生物学手段广泛应用于植物的遗传育种,基因组学的研究成为植物基因资源发掘的基本科学平台,分子育种成为植物育种的最主要手段之一。为加强与国际植物分子育种领域的合作与交流,推动应用基因与组学植物分子育种科学的发展。The Generation Challenge Programme(全球挑战计划)、国际水稻研究所、海南省科学技术协会、中国农业科学院、海南省热带农业资源开发利用研究所等单位发起,定于2007年3月23~27日在海南省三亚市举办“第二届植物分子育种国际学术研讨会”。

大会荣誉主席

Jean-Marcel Ribaut 博士,国际挑战计划主席,国际小麦玉米改良中心主任

张启发博士,亚洲水稻生物技术协作网指导委员会主席,中国科学院院士、华中农业大学教授,作物遗传改良国家重点实验室主任。

大会主席

黎志康博士,国际水稻研究所资深科学家、作物基因资源与遗传改良国家重大工程首席科学家、中国农科院作物所研究员、国际分子育种项目协调科学家

组委会执行委员

方宣钧博士,海南省热带农业资源开发利用研究所,所长、研究员,海南农作物分子育种重点实验室主任
黎志康博士,国际水稻研究所资深科学家、作物基因资源与遗传改良国家重大工程首席科学家、中国农科院作物所研究员、国际分子育种项目协调科学家

大会主题

本次大会主题为“应用基因组学与植物分子育种”。

主要议题

(一)应用植物基因组学:从基因组走向大田;(二)分子标记与植物育种:一种整合;(三)植物育种中新型的分子工具和技术;(四)转基因新技术、产品及其市场;(五)设计育种:基因发现和性状改良的连接;(六)转基因植物中知识产权的问题。

组委会办公室联系方式:

海南省海口市海秀中路 107 号北岸青年公寓 507 室,邮编:570206

电话:86-898-68966415 传真:86-898-68968180 手机:13807532037

<http://www.icpmb.org>

Email: xuanjunfang@vip.sina.com